

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

09/762131

30.05.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 6月 1日

REC'D 21 JUL 2000

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第153383号

WIPO

出 願 人

Applicant(s):

エーザイ株式会社

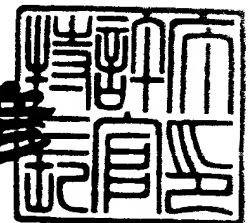
E SU

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3049110

【書類名】 特許願

【整理番号】 EP99TH0601

【提出日】 平成11年 6月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 39/00

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市梅園 2 - 6 - 1

【氏名】 山内 敏彦

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県北相馬郡守谷町松ヶ丘 3 - 1 - 1 4

【氏名】 横浜 廣光

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市中高津 2 - 1 0 - 2 6

【氏名】 小林 精一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県牛久市栄町 3 - 1 6 0 - 2

【氏名】 瀬戸 敏夫

【特許出願人】

【識別番号】 000000217

【住所又は居所】 東京都文京区小石川 4 丁目 6 番 1 0 号

【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

【代表者】 内藤 晴夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 004983

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】gp39 antagonistによるITP予防剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 T細胞表面上の接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する受容体gp39と、抗原呈示細胞表面上のCD40の間の相互作用を阻害するantagonistを有効成分とする特発性血小板減少性紫斑病（ITP）予防剤。

【請求項 2】 相互作用を阻害するantagonistが、抗gp39抗体である請求項 1 に記載のITP予防剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の発症が予想される患者に対し、gp39 antagonistを予防的に投与しITPの発症を予防する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

CD4<sup>+</sup>Th細胞表面上のgp39分子と抗原呈示細胞表面上のCD40分子の相互作用は、CD4<sup>+</sup>Th細胞が抗原呈示細胞表面のclass II MHC抗原上に呈示された抗原を認識して活性化するのに不可欠であり、この相互作用をgp39 antagonist、例えば抗gp39抗体で阻害すると、CD4<sup>+</sup>Thの不応答性T細胞寛容が誘導される（WO 95/06481）。

また同様にCD4<sup>+</sup>Th細胞表面上のgp39分子とB細胞表面上のCD40分子の相互作用は、B細胞が抗原刺激を受けて抗体産生細胞に分化するためにも不可欠であり、この相互作用をgp39 antagonist、例えば抗gp39抗体で阻害すると、抗体産生が抑制されることが知られている（WO 95/06480）。

この様にgp39 antagonistがCD4<sup>+</sup>Th細胞・B細胞両方の免疫応答を阻害することから、gp39 antagonistを自己抗原に対して免疫応答して病態を示す自己免疫性疾患（SLE、ITP等）の治療に応用しようという試みがなされている。しかしながらgp39 antagonistは、その作用メカニズムから、一旦成立してしまった段階から投与を初めて免疫不応答を誘導するよりも、免疫応答が開始される段階から不

応答性を誘導するほうが容易であると予想された。

【0003】

自己免疫性疾患の多くは、特定の遺伝子と連鎖していることが知られており、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）は、低親和性IgGレセプター遺伝子（Fc gamma RIIA）の遺伝子多型が相関することが示唆されている（Williams et al., British Journal of Haematology 101:779-82, 1998）。今後、1塩基多型（SNPs）地図の整備が進み、遺伝子診断の手法が高度化して更に相関の強いSNPsが見出されれば、ITPの発症が予知可能となることも推察される。そして、ITP発症が予想される人に対しては、血小板に対する免疫応答が開始される段階から、免疫不応答性を誘導するgp39 antagonistを投与すれば、ITP発症後に投与する場合と比較して、より容易に不応答性を誘導できると考えられる。

また、ステロイド剤等の投与により緩解期にあるITPの患者に対してgp39 antagonistを投与し、増悪期に誘導される血小板に対する免疫応答を抑制して不応答性を誘導できれば、緩解期を引き延ばすことが可能となり、その治療的価値は高いと予想した。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の発症が予測される患者、あるいはステロイド剤等の投与により緩解期にあるITPの患者に対しgp39 antagonistを予防的に投与し、ITPの発症あるいは再燃を防止するITP予防剤を開発することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、遺伝的に加齢に伴ってITP類似の病態（血小板減少症および抗血小板自己抗体産生）を発症するマウス、雄（NZW x BXSb）F1マウスに、この病態の発症に先だってgp39 antagonist、抗gp39抗体を投与することにより血小板減少症および抗血小板自己抗体産生の発症を効果的に予防できることを見出し、gp39 antagonistをITP予防剤として使用するという本発明を完成するに到った。

【0006】

【発明の実施の形態】

すなわち本発明は、T細胞表面上の接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する受容体gp39と、抗原呈示細胞表面上のCD40の間の相互作用を阻害するantagonistを有効成分とするITP予防剤、相互作用を阻害するantagonistが抗gp39抗体であるITP予防剤である。

本発明の種々の側面を以下の項目について詳細に説明する。

【0007】

1. gp39 antagonist: T細胞表面上の接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する受容体gp39と、抗原呈示細胞表面上のCD40の間の相互作用を阻害する薬剤をgp39 antagonistと定義する。gp39 antagonistには、gp39と相互作用する薬剤のみならず、CD40と相互作用する薬剤も含まれるものである。gp39 antagonistはgp39に対して向けられた抗体（例えばgp39に対するモノクローナル抗体）、gp39に対して向けられた抗体のフラグメント（例えばFab又は(Fab')<sub>2</sub>フラグメント）、キメラ抗体又はヒト化抗体、soluble CD40又はsoluble CD40L及びそれらのフラグメント、又はgp39とCD40の相互作用を阻害する化合物であってよい。

【0008】

2. 抗体: 哺乳動物（例えばマウス、ハムスター又はウサギ）は、該哺乳動物において免疫応答を引き起こす免疫原の形態のgp39蛋白質又は蛋白質断片（例えばペプチド断片）で免役することができる。

gp39蛋白質はgp39 cDNA (Armitage et al., Nature, 357: 80-82, 1992, Hollembaugh et al., EMBO J., 11: 4313-4319, 1992) を組み込んだ発現ベクターを宿主細胞、例えば細菌又は哺乳類細胞株中で発現させ、培養液から標準的な方法に従ってgp39蛋白質を精製することができる。また、例えばGST等との融合蛋白質として発現させ、GSTとの融合蛋白質の場合はグルタチオンカラムにより精製しても構わない。gp39ペプチドはgp39のアミノ酸配列 (Armitage et al., Nature, 357: 80-82, 1992, Hollembaugh et al., EMBO J., 11: 4313-4319, 1992) に基づき、公知の方法（例えば、F-moc又はT-boc化学合成）により合成することができ、合成されたペプチドは適当な担体、例えばKLHと結合させることで免疫原性を高めることも許される。

精製されたgp39蛋白質又はペプチド断片をアジュバントと共に免疫後、抗血清を得ることができ、所望なら抗血清からポリクローナル抗体を単離することができる。また、モノクローナル抗体を産生するには、抗体産生細胞（リンパ球）を免疫動物より回収し、標準的な細胞融合法によりミエローマ細胞と融合させて細胞を不死化し、ハイブリドーマ細胞を得る。かかる技術は当該技術分野では確立された方法であり、適当なマニュアル（Harlow et al, Antibodies: A Laboratory Manual, 1998, Cold Spring Harbor Laboratory）に準じて行うことができる。更に、モノクローナル抗体はヒトモノクローナル抗体を産生するためのヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozbar et al., Immunol. Today, 4: 72, 1983）、EBV-ハイブリドーマ法（Cole et al., Monoclonal Antibody in Cancer Therapy, 1985, Allen R. Bliss, Inc., pages 77-96）、Combinatorial抗体ライブラリーのスクリーニング（Huse et al., Science, 246: 1275, 1989）等他の方法により作製しても良い。

本明細書における抗体は、gp39と特異的に結合する抗体のフラグメント、例えばFab又は(Fab')<sub>2</sub>フラグメントをも包含するものである。

ヒト以外の動物、例えばマウスを免疫動物として作製されたマウスモノクローナル抗体は、ヒトに投与した場合異種蛋白質として認識されて、モノクローナル抗体に対する免疫応答を生じさせてしまう。この問題点を回避する一つの方法はキメラ抗体、すなわち抗原結合領域がマウスモノクローナル抗体由来、それ以外の領域がヒト抗体由来の抗体である。本発明はキメラ抗体も含むものである。キメラ抗体としては、抗原結合領域としてマウスモノクローナル抗体の可変領域全体を使ったキメラ抗体（Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851, 1985、Takeda et al., Nature, 314: 452, 1985）、また抗原結合領域としてヒト由来のフレームワーク領域とマウスモノクローナル抗体由来の超可変領域を組み合わせて使ったキメラ抗体（Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 7308-12, 1983、Kozbar et al., Immunol. Today, 4: 7279, 1983）が挙げられるが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0009】

【発明の効果】

特発性血小板減少性紫斑病 ( ITP ) の発症が予測された場合、gp39 antagonistを予防的に投与し、ITPの発症を防止することが可能となった。

【 0 0 1 0 】

【実施例】

本発明を下記実施例により更に詳しく説明するが、本発明はこれに限られるものではない。

以下の実施例で使用した抗gp39抗体MR1 (Noelle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6550-54, 1992) は、ハムスターで作製したマウスgp39に対するモノクローナル抗体でPharMingen社より入手可能 (Catalog No.: PM-09020D or PM-09021D) である。またMR1産生細胞は、American Type Culture Collection (ATCC) より入手可能である (ATCC No.: HB-11048) 。

使用した(NZW×BXS<sub>B</sub>)F<sub>1</sub>マウスは、生後3ヶ月以降に血中に血小板に対する自己抗体が出現し、加齢と共に血小板数の著明な減少が見られ (池原, 代謝, 26: 169-179, 1989) 、ITPのモデルとも考えられている (Adachi et al., Immunobiology, 198: 451-64, 1998) 。このマウスは日本SLCより入手可能である。

【 0 0 1 1 】

実施例 1 (NZW×BXS<sub>B</sub>)F<sub>1</sub>マウスにおける致死に対するMR1の抑制効果。

MR1の、(NZW×BXS<sub>B</sub>)F<sub>1</sub>マウスにおける致死に対する抑制効果を検討した。MR1 (Noelle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6550-54, 1992) は、Noelle博士より分与されたMR1産生細胞の培養上清よりprotein Aを用いて精製して使用した。MR1及び陰性対照のハムスター IgGは、マウス腹腔内に500 µg/200 µL/回の用量を5～16週齢にわたって週1回投与した。

その結果、ハムスター IgGを投与した(NZW×BXS<sub>B</sub>)F<sub>1</sub>対照群では9週齢より死亡が観察された。この群では15週齢までに生存率は50%に低下し、試験終了時の17週齢までこのレベルで推移した。一方、MR1投与群では試験期間中全く死亡例は認められず、この群の生存率は対照群に比べ統計学的に有意に改善された (p<0.05、図1) 。

【 0 0 1 2 】

実施例 2 (NZW×BXS<sub>B</sub>)F<sub>1</sub>マウスの血小板減少に対するMR1の抑制効果。



MR1の、(NZW×BXS<sub>B</sub>)F<sub>1</sub>マウスの血小板減少に対する抑制効果を検討した。MR1及び陰性対照のハムスター IgGは、マウス腹腔内に500 μg/200 μL/回の用量を5～16週齢にわたって週1回投与した。採血は5, 9, 13, 17週齢時にエーテル麻酔下、眼底より約300μLをヘパリン処理ヘマトクリット毛細管を用いてEDTA処理チューブに採取した。また採血した血液中の血小板数は、総合血液学検査装置システムTechnicon H・1<sup>TM</sup> system (Bayer Corporation, Tarry Town, NY) を用いて測定した。

その結果、ハムスター IgG対照群マウスの血小板数は13及び17週齢において5週齢時に比較してそれぞれ26及び45%の減少が認められた。一方MR1投与群では試験終了時の17週齢においても殆ど血小板数の低下は認められず、MR1群と対照群との間には統計学的に有意な差が認められた (p<0.05、図2)。

#### 【0013】

実施例3 (NZW×BXS<sub>B</sub>)F<sub>1</sub>マウスの血漿中抗血小板IgG 抗体価に対するMR1の抑制作用。

MR1の、(NZW×BXS<sub>B</sub>)F<sub>1</sub>マウスの血漿中抗血小板IgG 抗体価に対する抑制作用を検討した。血漿中抗血小板抗体価は、実施例2で採取した血液より分離した血漿を、96 well plateにglutaraldehydeで固定したマウス血小板と反応させた後、Peroxidase標識抗マウスIgGで検出するELISAにより測定した。抗体価は同系マウスの35週齢血清を標準血清として用い、その血清を1000 U/mlとして実試料の抗体価 (A.U./ml) を算出した。

その結果、ハムスター IgG対照群では血漿中抗血小板IgG抗体価が9週齢より上昇し、13週齢でピークに達した。MR1はこの血中自己抗体の上昇を試験終了時の17週齢までほぼ完全に抑制しており、MR1群と対照群との間には統計学的に有意な差が認められた (p<0.05、図3)。

#### 【0014】

実施例4 (NZW×BXS<sub>B</sub>)F<sub>1</sub>マウスにおける血小板結合性抗血小板IgG 抗体価に対するMR1の抑制作用。

MR1の、(NZW×BXS<sub>B</sub>)F<sub>1</sub>マウスの血小板結合性抗血小板IgG 抗体価に対する抑制作用を検討した。血小板結合抗血小板抗体価は、実施例2で採取した血液より

分離した血小板を、FITC標識抗マウスIgG (Fc)と反応させて、血小板に結合した蛍光色素をFACScan<sup>TM</sup> flow cytometer (Beckton-Dickinson, San Jose, CA)を用いて測定し、BALB/cマウスの血小板(陰性対照)に比して高い蛍光強度を示す血小板の比率を各個体毎に算出して、この値を血小板結合性抗血小板IgG抗体価として表した。

その結果、ハムスター IgG対照群のマウスでは13週齢以降血小板結合性抗血小板IgG抗体の上昇が認められた。これらのマウスでは平均して13週齢では約87%、17週齢では約83%の血小板上にIgG抗体が検出された。これに対しMR1投与群では試験終了時17週齢までこのパラメーターの明らかな上昇は見られず、MR1群と対照群との間には統計学的に有意な差が認められた ( $p < 0.05$ 、図4)。

【 0 0 1 5 】

【図面の簡単な説明】

【図1】 (NZW×BXSB) $F_1$ マウスにおける致死に対するMR1の抑制効果。

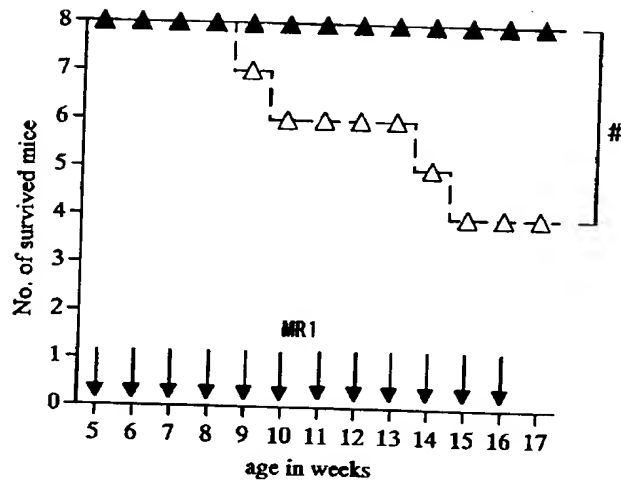
【図2】 (NZW×BXSB) $F_1$ マウスの血小板減少に対するMR1の抑制効果。

【図3】 (NZW×BXSB) $F_1$ マウスの血漿中抗血小板IgG 抗体価に対するMR1の抑制作用。

【図4】 (NZW×BXSB) $F_1$ マウスにおける血小板結合性抗血小板IgG 抗体価に対するMR1の抑制作用。

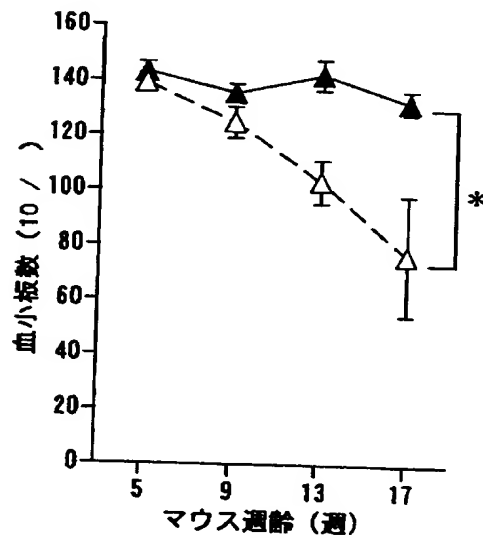
【書類名】 図面

【図 1】



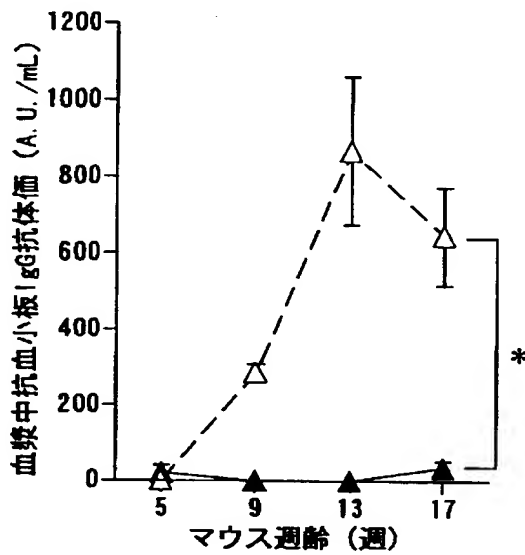
▲ : MR1 (500  $\mu$ g/マウス) ,  $\Delta$  : 対照群。値は各週齢における生存数を示す。  
# :  $p < 0.05$  (Log-rank 検定)

【図 2】



▲ : MR1 (500  $\mu$ g/マウス) ,  $\Delta$  : 対照群。値は生存マウスでの平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。  
\* :  $p < 0.05$  (経時的分散分析)

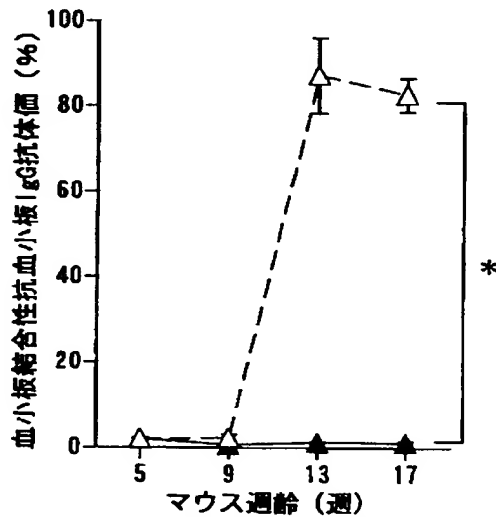
【図 3】



▲ : MR1 (500  $\mu$ g/マウス), △ : 対照群。値は生存マウスでの平均値±標準誤差を示す。

\* :  $p < 0.05$  (経時的分散分析)

【図 4】



▲ : MR1 (500  $\mu$ g/マウス), △ : 対照群。値は生存マウスでの平均値±標準誤差を示す。

\* :  $p < 0.05$  (経時的分散分析)

【書類名】要約書

【要約】

【課題】本発明の課題は、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の発症が予測される患者、あるいはステロイド剤等の投与により緩解期にあるITPの患者に対して予防的に投与し、ITPの発症あるいは再燃を防止するITP予防剤を開発することにある。

【解決手段】ITPの発症あるいは再燃が予測される場合において、gp39 antagonistを予防的に投与し、ITPの発症あるいは再燃を防止することが可能となった。

【選択図】なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000217]

1. 変更年月日	1990年 8月29日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都文京区小石川4丁目6番10号
氏 名	エーザイ株式会社